PCT/JP2004/018042

14.12.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

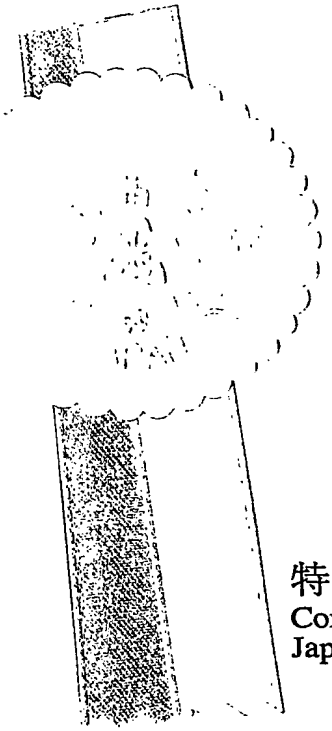
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: ２００３年１２月　５日

出願番号
Application Number: 特願２００３－４０８１０３

[ST. 10/C]: [ＪＰ２００３－４０８１０３]

出願人
Applicant(s): 扶桑薬品工業株式会社



２００５年　１月２７日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋

BEST AVAILABLE COPY

出証番号　出証特２００５－３００３２８９

【書類名】　特許願
【整理番号】　F2-A0301
【提出日】　平成15年12月 5日
【あて先】　特許庁長官　殿
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府堺市東浅香山町４－１－１５　５－１３１２
　【氏名】　山崎伸二
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府大阪市城東区森之宮２－３－３０　扶桑薬品工業株式会社　研究開発センター　内
　【氏名】　朝倉昌博
【特許出願人】
　【識別番号】　000238201
　【氏名又は名称】　扶桑薬品工業株式会社
【代理人】
　【識別番号】　100102978
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　清水　初志
【選任した代理人】
　【識別番号】　100108774
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　橋本　一憲
【手数料の表示】
　【予納台帳番号】　041092
　【納付金額】　21,000円
【提出物件の目録】
　【物件名】　特許請求の範囲　1
　【物件名】　明細書　1
　【物件名】　図面　1
　【物件名】　要約書　1

【書類名】特許請求の範囲
【請求項１】
細胞膨張化致死毒をコードする下記（ａ）から（ｄ）のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
（ａ）配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
（ｂ）配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド
（ｃ）配列番号：２から４に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
（ｄ）配列番号：１に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド
【請求項２】
請求項１に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３】
請求項１に記載のポリヌクレオチドまたは請求項２に記載のベクターを保持する宿主細胞。
【請求項４】
請求項１に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
【請求項５】
請求項３に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項４に記載のポリペプチドの製造方法。
【請求項６】
請求項４に記載のポリペプチドに結合する抗体。
【請求項７】
被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）および（ｂ）の工程を含む方法。
（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程
（ｂ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程
【請求項８】
被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）から（ｃ）の工程を含む方法。
（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程
（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを鋳型に、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程
（ｃ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程
【請求項９】
共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
特異的なプライマー対の混合物として、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー対を用いる、請求項７または８に記載の方法。

（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
【請求項１１】
被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む方法。
（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程
（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを制限酵素により切断する工程
（ｃ）切断されたDNA断片の分子量から、これら細菌の存在を判定する工程
【請求項１２】
制限酵素が、Sau3AI、Dsa I、Mbo I、Rsa I、EcoR I、HinfI、Nde I、Pst I、Xba I、Xho IIからなる群より選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
請求項７に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物とを含むキット。
【請求項１５】
特異的なプライマー対の混合物が、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー対である、請求項１４に記載のキット。
（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対共通プライマー対
【請求項１６】
請求項８に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、下記（ａ）または（ｂ）とを含むキット。
（ａ）カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物
（ｂ）カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対。

【請求項１７】
特異的なプライマー対の混合物が、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー対である、請求項１６に記載のキット。
（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
【請求項１８】
共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、請求項１６に記載のキット。
【請求項１９】
請求項１１に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対とを含むキット。
【請求項２０】
共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、請求項１９に記載のキット。

【書類名】明細書
【発明の名称】細胞膨張化致死毒およびそれを標的としたカンピロバクター属に属する細菌の検出
【技術分野】
【０００１】
本発明は、カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒およびそれをコードするポリヌクレオチドに関する。さらに本発明は、カンピロバクター・コリを含むカンピロバクター属に属する細菌の細胞膨張化致死毒を標的とした、検体（臨床検体、食品など）中のカンピロバクター（Campylobacter）属細菌の存在の有無を判定するための方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
カンピロバクター属細菌は、ヒト、および野生または家畜動物の病原菌であって、動物における流産や腸炎、ヒトにおける腸炎の原因菌である。ヒトの場合、カンピロバクター感染症の起因菌としては、カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）およびカンピロバクター・コリ（Campylobacter coli）が知られており、これらの細菌は、食中毒菌として指定されている（非特許文献１、２参照）。
【０００３】
2000年現在、カンピロバクターは15菌種9亜種に分類されているが、ヒトの下痢症から分離される菌種は、C.ジェジュニが95～99％を占め、C.コリなどのその他の菌種は数％である（非特許文献３参照）。なお、C.コリはブタでの保菌率が極めて高い。近年、カンピロバクター感染症は、東南アジアを中心とした輸入食肉の増加に伴い増加傾向にあり、特にBSEやO-157等の問題によって牛肉の代替品として消費量が伸びている鶏肉関連食品による感染例が急増している。
【０００４】
カンピロバクター属細菌は、通常、ウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ等の動物の腸管に高率に分布しており、人獣共通感染症として認識されている。その多くは鶏肉が原因と考えられているが、これらの動物もしくは排泄物との直接的接触や、排泄物によって汚染された食物、飲料水、牛乳などの摂取により感染する。さらに、新生児室などの施設内感染例も報告されている（非特許文献４参照）。
【０００５】
カンピロバクター感染症は、潜伏期が3～7日と長く、下痢（ときに血粘膜性下痢）、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、悪寒、倦怠感などの胃腸炎症状を引き起こすのが特徴である。致死性は低いが、新生児では敗血症や髄膜炎などの全身感染を起こすことがある。多くの場合、数日から１週間程度で回復し、一般的な予後については、一部の免疫不全患者を除き良好な経過を辿る。しかし、近年カンピロバクターの後感染性疾患として自己免疫疾患であるギラン・バレー症候群やフィッシャー症候群に進展する例が報告されている。カンピロバクター感染症に後発する症例は概して重症化しやすく、発症1年後の寛解率は約6割程度に止まる。
【０００６】
重篤な病態や敗血症の併発例では抗生剤による化学治療が行われる。第一選択薬剤はエリスロマイシン等のマクロライド系薬剤である。セフェム系薬剤に対しては自然耐性を示すため、治療効果は望めない。一方、近年、ニューキノロン系薬剤に対しては、耐性菌の増加が問題となっている。カンピロバクター感染症に対し的確な治療を施し、併せて感染経路を解明して感染拡大を食い止めるためには、感染後、迅速に原因菌を同定することが重要である。しかしながら、臨床症状からカンピロバクター感染を診断することは困難であり、カンピロバクターの同定および菌種の決定は容易ではない。
【０００７】
カンピロバクター属細菌は微好気性細菌であり、培養にはスキロー培地などの特殊な培地、および酸素濃度を3～10％の絶対微好気性条件に保つための特殊な装置（嫌気ジャー等）が必要で、なおかつ他の細菌より培養に時間を要する（2～3日）ことから、分離培養

が困難なものとなっている。また、カンピロバクター属細菌は、空気中で死滅しやすく、検体採取後、2～3時間以内に検査する必要がある。さらに、カンピロバクター感染症は潜伏期間が長い（3～7日）ため、病状が現れてから関与食品の細菌同定を行っても菌が単離できない場合が多い。さらにカンピロバクター属細菌は、非常に感染力が強く、数百個の菌数で感染が成立するという報告もあり、感染源の特定は極めて困難なものとなっている。

【０００８】

C.ジェジュニとC.コリの識別診断に、馬尿酸塩の加水分解を検査する方法がある。すなわち、C.ジェジュニは馬尿酸を加水分解できるが、C.コリはできないという性質を利用する。しかしながら、馬尿酸一陰性C.ジェジュニ株が存在するため、この方法も確実ではない（非特許文献５参照）。従って、現在は摂食履歴と症状によるカンピロバクター菌の存在の推定、および便培養から得られたコロニーについて数日を要して菌の形態学的および生物学的特徴を検査することにより、その存在を確認しているのが現状である。

【０００９】

そこで、培養検査によらない迅速診断法として、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法やPCR法を利用した遺伝子的診断法によるカンピロバクター属細菌の同定や毒素遺伝子の検出が試みられている。たとえば、カンピロバクター属細菌の場合、一般にrRNAをコードする遺伝子がプローブとして使用されている（特許文献１参照）。このrRNAの遺伝子配列は既に公表されている（非特許文献６参照）。また、カンピロバクター属細菌検出用の核酸フラグメントも知られている（特許文献２、３、４、５、６参照）。しかしながら、これらの配列は、C.ジェジュニおよび／またはC.コリの検出用であり、その他のカンピロバクター属細菌の検出には適当でない。さらに、特異性が充分ではなかった。

【００１０】

また、C.コリVC167のfla A遺伝子から選択したオリゴヌクレオチドを用いたPCRによって、C.ジェジュニを同定する方法が報告されている（非特許文献７参照）。さらに、C.ジェジュニおよびC.コリ中に見出されるスーパーオキシドジスムターゼ標的配列を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーが報告されている（特許文献７参照）。しかし、これらの方法ではC.ジェジュニとC.コリを区別することができない。

【００１１】

一方、カンピロバクター属細菌の病原因子についての研究も盛んである。カンピロバクター属細菌の病原因子としては、細胞侵入性やフラジェリン、コレラ毒素様エンテロトキシン等の様々な因子が報告されている（非特許文献８、９参照）が、近年、C.ジェジュニから毒性因子として細胞膨張化性致死毒（Cytolethal Distending Toxin：CDT）が発見され（非特許文献１０）、病原性との関連性が注目されている。例えば、志賀赤痢菌（Shigella dysenteriae）のCDTを産生する組換え大腸菌を用いた動物投与モデルでは下痢原性が報告されている（非特許文献１１）。

【００１２】

CDTはcdtA、cdtBおよびcdtCと称される3種のサブユニットからなるホロ毒素であり、タンデムに並んだ遺伝子にコードされている。毒素活性中心はcdtBサブユニットの持つI型デオキシリボヌクレアーゼ様活性であり、cdtAサブユニットとcdtCサブユニットは標的細胞への接着に関与すると考えられている。このホロ毒素が細胞に作用すると、細胞が膨化、すなわち大きくふくらみ、最終的には細胞が死滅することから、細胞膨張化性致死毒と名付けられている。

【００１３】

その分子機構は活性毒素中心であるcdtBサブユニットが細胞内の核に移行し、I型デオキシリボヌクレアーゼ活性により、染色体DNAにニックを挿入し、DNA損傷応答（DNA-damage response）を引き起こす。そして、細胞は遺伝子修復系を動かすために細胞周期をG2/M期で停止後、膨張化致死すると考えられている（非特許文献１２）。さらに、CDTは上皮系細胞、免疫担当細胞等の幅広い細胞に作用することが確認されており、中でもヒトリンパ球に作用し、アポトーシスを引き起こすことにより免疫から逃れやすくなっていると考

えられている（非特許文献１３）。

【００１４】

このようにCDTは、これまでの毒素には見られないユニークな分子機構を有しているが、これまでカンピロバクター属細菌でCDTの全塩基配列が明らかとなっているのは、C.ジェジュニのみである（非特許文献１０）。

【特許文献１】特開昭６２－２２８０９６号公報
【特許文献２】特開平２－８４２００号公報
【特許文献３】特開平２－１５４７００号公報
【特許文献４】特開平３－１１２４９８号公報
【特許文献５】特開平６－９０７９５号公報
【特許文献６】特開平６－９０７９６号公報
【特許文献７】特開２０００－３１６５９０公報
【非特許文献１】Blaser, et al, Ann. Intern. Med., 91:179 (1979)
【非特許文献２】Tauxe, R., American Society for Microbiology, Washington DC. pg.9(1992)
【非特許文献３】Takahashi, M. et al, Infectious Diseases Weekly Report Japan, 3(6):10 (2001)
【非特許文献４】小児内科, 29:1219-1222 (1997)
【非特許文献５】Totten, et al, J. Clin. Microbiol., 25: 1747 (1987)
【非特許文献６】Romaniuk, P. J. et al, J. Bacteriol., 169: 2173 (1987)
【非特許文献７】Oyofo, et al, J. Clin. Microbiol., 30: 2613 (1992)
【非特許文献８】Mizuno, K. et al, Microbios., 78: 215 (1994)
【非特許文献９】Suzuki, S. et al, FEMS Immunol. Med. Micribiol., 8: 207 (1994)
【非特許文献１０】Pickett, C. et al. Infect. Immun., 64: 2070 (1996)
【非特許文献１１】Infect. Immun., 65: 428-433 (1997)
【非特許文献１２】Science, 290: 354-357 (2000)
【非特許文献１３】J. Biol. Chem., 276: 5296-5302 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

以上詳細に述べたように、カンピロバクター属細菌による感染症の迅速診断が求められている一方、カンピロバクター属細菌の病原因子は完全に解明されているとは言い難い。これまで、各菌種の血清型等を利用した菌種同定用PCRプライマーや、CDT産生を調べる共通プライマー等が利用されてきたが（J. Applied Microbiol., 94: 1003-1014 (2003)）、増菌培養工程が必要であり、カンピロバクター属細菌の迅速な検出は不可能であった。

【００１６】

そこで、本発明は、遺伝子診断により、カンピロバクター属細菌の迅速な検出を可能とすべく、カンピロバクター属に属し、いまだそのCDTの塩基配列が解明されていないカンピロバクター・コリのCDTおよびそれをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。

【００１７】

さらに、本発明は、カンピロバクター・コリの塩基配列から得られた知見に基づき、カンピロバクター・コリを含むカンピロバクター属細菌のCDTを標的とした、カンピロバクター属細菌の存在を迅速に検出しうる方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【００１８】

CDT遺伝子のクローニングにおいて、制限酵素HindIIIを用いたクローニングを行った場合、コード領域中にHindIIIサイトが存在するため、全長を単離することはできない。他方、EcoRI、PstI、KpnI、XbaI、BamHI、SalI、XhoI等の一般的な制限酵素を用いると、cd

t遺伝子のクローニングに最適な長さの断片（3kbから5kb）が得られなかった。そこで、本発明者らは種々検討を行なった結果、HindIIIで完全にcdt遺伝子が消化されないようなパーシャルな条件を選択し、切断することにより、遂に、cdt遺伝子の内部配列が切断されていない完全長の遺伝子をクローニングすることに成功した。

【００１９】

また、本発明者らは、C.ジェジュニ、C.フィータスのCDTとの比較を行ない、３種のカンピロバクター属細菌に共通するプライマーおよびこれら細菌のそれぞれに特異的なプライマーを開発した。そしてこのプライマーが、簡便かつ迅速にカンピロバクター属細菌CDTの有無の判定、および菌種の同定が同時に行えるマルチプレックスPCR法に適用でき、さらにPCR-RFLP法によるタイピングにも利用できることを明らかにした。

【００２０】

すなわち、本発明は、具体的に以下の技術的態様が包含される：

（１）　細胞膨張化致死毒をコードする下記（ａ）から（ｄ）のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

（ａ）配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｂ）配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

（ｃ）配列番号：２から４に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｄ）配列番号：１に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

（２）　（１）に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

（３）　（１）に記載のポリヌクレオチドまたは（２）に記載のベクターを保持する宿主細胞。

（４）　（１）に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

（５）　（３）に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、（４）に記載のポリペプチドの製造方法。

（６）　（４）に記載のポリペプチドに結合する抗体。

（７）　被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）および（ｂ）の工程を含む方法。

（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程

（ｂ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程

（８）　被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）から（ｃ）の工程を含む方法。

（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程

（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを鋳型に、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程

（ｃ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程

（９）　共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、（８）に記載の方法。

（１０）　特異的なプライマー対の混合物として、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー

対を用いる、（７）または（８）に記載の方法。
（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（１１）　被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む方法。
（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程
（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを制限酵素により切断する工程
（ｃ）切断されたDNA断片の分子量から、これら細菌の存在を判定する工程
（１２）　制限酵素が、Sau3AI、Dsa I、Mbo I、Rsa I、EcoR I、HinfI、Nde I、Pst I、Xba I、Xho IIからなる群より選択される、（１０）に記載の方法。
（１３）　共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、（１１）に記載の方法。
（１４）　（７）に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物とを含むキット。
（１５）　特異的なプライマー対の混合物が、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー対である、（１４）に記載のキット。
（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対共通プライマー対
（１６）　請求項８に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、下記（ａ）または（ｂ）とを含むキット。
（ａ）カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物
（ｂ）カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対。
（１７）特異的なプライマー対の混合物が、以下の（ａ）から（ｃ）のプライマー対である、（１６）に記載のキット。
（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対

（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対
（１８）共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、（１６）に記載のキット。
（１９）　（１１）に記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対とを含むキット。
（２０）共通プライマー対が、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対である、（１９）に記載のキット。
【００２１】
なお、本明細書において「細胞膨張化致死毒」とは、cytolethal distending toxin（CDTまたはCLDT）と呼ばれる、蛋白性のA-B型ホロトキシンのグループに属する毒素因子を指す。このものは、ほかに細胞膨化致死毒（素）、細胞膨潤化致死毒（素）などと称されることもある。細胞膨張化致死毒は、A,B,Cの３ユニットからなるサブユニット構造を有し、Bサブユニットが毒素活性中心ユニットであり、AおよびBサブユニットが細胞接着に関わっていると考えられている。細胞に作用すると細胞が大きく膨らむ等の変形が生じ、最終的に細胞死を引き起こす。毒素原性大腸菌が産生する易熱性エンテロトキシン（LT）などを実験的に細胞に作用させた場合にも細胞が大きく膨らむ等の変形が見られるが、毒素を取り除いた場合、細胞は回復し、致死することはない。しかしながら、CDTを除去しても細胞は回復せず、死に至る。
【００２２】
本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドであって、複数の塩基または塩基対からなる重合体を意味する。ポリヌクレオチドには、一本鎖型および二本鎖型のDNAを含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾された塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。
【００２３】
本明細書において用いられる「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸からなる重合体を意味する。従って、オリゴペプチドおよびタンパク質もまた、ポリペプチドの概念に含まれる。ポリペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、γ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化などが含まれる。
【００２４】
本明細書において「単離」とは、本来の環境（たとえば自然に発生するのであればその自然環境）から取り出された物質（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、その自然状態から「人の手によって」変えられたものである。「単離」とは、対象化

合物に実質的に富む試料中に存在する化合物および／または対象化合物が部分的または実質的に精製されている試料中に存在する化合物を含むことを意味する。ここで「実質的に精製した」という用語は、その天然の環境から切り離されて、天然に関連している他の成分を少なくとも60%、好ましくは75%、および最も好ましくは90%含まない化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指す。

【００２５】

本明細書において用いられる「変異」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の変化または塩基配列における塩基の変化（すなわち単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換、欠失、付加または挿入）を指す。従って、本明細書において用いられる「変異体」は、一つ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列または一つ以上の塩基が変化している塩基配列を指す。この変異体の塩基配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。変異体はアレリック変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的変化を有しうる。まれに、変異体は、非保存的置換を有しうる。生物学的または免疫学的活性を阻害することなく、いずれの、およびどれほど多くのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失するかを決定する手引きは、当技術分野において周知のコンピュータープログラム、例えばDNAスター・ソフトウェアを用いて発見することができる。

【００２６】

「欠失」はその中で１つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化である。

【００２７】

「挿入」または「付加」は、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、それぞれアミノ酸またなヌクレオチド残基１つ以上が付加されたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

【００２８】

「置換」とは、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、アミノ酸またはヌクレオチド１つ以上がそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドに入れ替えられたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

【００２９】

本明細書において用いられる「ハイブリダイズ」とは、核酸鎖が塩基対形成を通じて相補鎖と結合するプロセスを意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３０】

＜ポリヌクレオチド＞

本発明は、カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより同定されたカンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：１に、該ポリヌクレオチドによってコードされる３つのポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：２から４に示す。

【００３１】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：２から４に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、遺伝コードの縮重により配列番号：１に記載の塩基配列と異なる塩基配列からなるが配列番号：２から４に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、さらに、これ

らポリヌクレオチドがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドの配列とその全長において少なくとも40％以上、好ましくは60％以上、さらに好ましくは80％以上、さらに好ましくは90％以上、さらに好ましくは95％以上、さらに好ましくは97％以上（例えば、98～99％）同一である塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。塩基配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)。本発明のポリヌクレオチドには、上記のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

【００３２】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、例えば、菌体中のゲノムDNAのような天然源から得ることができる。また、菌体中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから得ることもできる。また、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

【００３３】

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：１）と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーション技術（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)や遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を利用して調製することができる。即ち、ハイブリダイゼーション技術を利用して、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：１）またはその一部をもとに、これと相同性の高いDNAを単離することができる。また、遺伝子増幅技術を用いて、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：１）の一部を基にプライマーを設計し、該ポリヌクレオチドの配列と相同性の高いポリヌクレオチドを単離することができる。従って、本発明には、配列番号：１に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【００３４】

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号：１に記載の塩基配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)）を利用して調製することもできる。また、このようなポリヌクレオチドは、自然界における変異により生じることもある。本発明には、このような塩基配列の変異により、配列番号：２から４に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などされたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【００３５】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片単独、他のコード配列（例えば、リーダーもしくは分泌配列、プレ-、プロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードするもの）と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカー配列は、pcDNA3.1/Myc-Hisベクター(Invitrogen社)により提供されかつGentz ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはMycタグである。また、このポリヌクレオチドは5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNA安定化配列を含んでいてもよい。

【００３６】

＜ポリペプチド＞

本発明は、本発明者らが同定したカンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒のポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有していることを意味する。

【００３７】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の1つの態様としては、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5)) が含まれる。また、ポリペプチド中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：２から４）において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異したタンパク質であって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドが含まれる。

【００３８】

置換されるアミノ酸は、タンパク質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい（保存的置換）。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

【００３９】

これらポリペプチドにおけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

【００４０】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4)を利用して本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号：１）またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることは、通常行いうることである。このように本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズするDNAに

よりコードされるポリペプチドであって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドもまた本発明のポリペプチドに含まれる。

【００４１】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【００４２】

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上（例えば、98～99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

【００４３】

また、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を用いて本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号：１）の一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列と相同性の高いDNA断片を単離し、該DNAを基に本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることも可能である。

【００４４】

＜ポリペプチドの断片＞

本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上（例えば、15アミノ酸残基以上）の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、αヘリックスとαヘリックス形成領域、βシートとβシート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、α両親媒性領域、β両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、本発明のポリペプチドの活性を媒介するものである。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含ま

れる。これらのポリペプチド断片は、抗原活性を含めた本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、Ala, Val, LeuとIleの間、SerとThrの間、酸性残基 AspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基 LysとArgの間、または芳香族残基 PheとTyrの間で起こる。

【００４５】

＜ポリペプチドの製造＞

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせにより製造されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドの製造のための手段は当業界でよく理解されている。組換え的なポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したポリペプチドを精製することにより調製することが可能である。一方、天然由来のポリペプチドは、例えば、後述する本発明のポリペプチドに対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso,M.C.,Jackson,R.J.(1989) NAR 17:3129-3144」参照）などにより本発明のポリペプチドを調製することも可能である。本発明のポリペプチドの断片は、例えば、本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

【００４６】

＜プローブ・プライマー＞

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：１に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合は U）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15～100ヌクレオチド、好ましくは15～35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のヌクレオチドが用いられる。

【００４７】

このようなヌクレオチドの一つの態様は、本発明のポリペプチドをコードするDNAに特異的になものである。「特異的な」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、特定のポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。好ましい態様は、カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNA（配列番号：１）にハイブリダイズし、カンピロバクター・ジェジュニおよびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAとハイブリダイズしないポリヌクレオチドである。このようなポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対が挙げられる。

【００４８】
また、本実施例により、カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNA（配列番号：１）が明らかにされたことに伴い、カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的な塩基配列およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的な塩基配列を、本発明者らは見出した。従って、本発明は、カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的なプライマー対およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的なプライマー対をも提供する。カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的なプライマーとしては、例えば、配列番号：１１、１２、１７－２７に記載のプライマーが、カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに特異的なプライマーとしては、例えば、配列番号：１５、１６、３７－４６に記載のプライマーが挙げられるが、これらに制限されない。
【００４９】
また、本実施例により、カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNA（配列番号：１）が明らかにされたことに伴い、本発明者は、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAに対する共通プライマー（これらすべての細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうるプライマー）を見出した。本発明は、このような共通プライマーをも提供する。好ましい共通プライマーとしては、例えば、配列番号；７－１０、４７－５０に記載のプライマーが挙げられる。
【００５０】
当業者にとっては、上記のプライマーに対して、1若しくは複数の塩基が異なるが、上記のプライマーと同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマーを調製することは、適宜行ないうることである。本発明は、このような変異プライマーをも提供するものである。変異プライマーは合成により調製することができ、また、変異プライマーが、変異前のプライマーと同一のゲノムDNA領域を増幅しうるかは、変異プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応を行い、その増幅産物を分析することにより、簡便に評価することができる。
【００５１】
これらプライマーは、被検試料中のヘリコバクター属細菌の存在の検出に好適に利用することができる。
【００５２】
＜ベクター、宿主細胞、ポリペプチドの製造＞
本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの生産方法を提供する。
【００５３】
本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製）などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。
【００５４】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

【００５５】

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【００５６】

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。

【００５７】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

【００５８】

＜抗体＞

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

【００５９】

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【００６０】

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはそのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグ

ラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

【００６１】

本発明の抗体は、被検試料中の本発明のポリペプチドの検出や精製に用いることもできる。

【００６２】

＜被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出＞

本発明は、被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出方法を提供する。被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出は、カンピロバクター感染症の診断、カンピロバクター属細菌に汚染された食品の迅速診断、食品加工工程のバリデーション、食中毒発生時における原因菌の同定など種々の目的において有用である。

【００６３】

本発明の検出方法の一つの態様は、被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程、および（ｂ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程、を含む方法である。

【００６４】

また、本発明の検出方法の他の態様は、被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法であって、（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程、（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを鋳型に、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAのそれぞれに特異的なプライマー対の混合物を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程、および（ｃ）これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAの増幅断片の有無または分子量から、これら細菌の存在を判定する工程、を含む方法である。

【００６５】

上記のように、複数のPCRプライマーを単一の反応系で使用するPCRは、マルチプレックスPCR法と呼ばれ、PCR産物を電気泳動し、バンドのサイズを見ることで複数の菌種を同時に鑑別することができる。本発明は、このマルチプレックスPCR法に好適に用いられるPCRプライマーおよびその組み合わせを提供する。

【００６６】

これら方法における、特異的なプライマー対の混合物としては、例えば、次の、（ａ）から（ｃ）のプライマー対の混合物を用いることができる。（ａ）カンピロバクター・コリの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１３、１４、２８－３６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対、（ｂ）カンピロバクター・ジェジュニの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１１、１２、１７－２７から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対、（ｃ）カンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅するための、配列番号：１５、１６、３７－４６から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対。また、共通プライマー対としては、例えば、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対を用いることができる。

【００６７】

本発明の検出方法のさらなる態様は、被検試料中の、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの存在を検出する方法で

あって、（ａ）被検試料に対し、これら細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAを増幅しうる共通プライマー対を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程、（ｂ）工程（ａ）により増幅されたゲノムDNAを制限酵素により切断する工程、（ｃ）切断されたDNA断片の分子量から、これら細菌の存在を判定する工程、を含む方法である。この方法に用いうる制限酵素としては、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ、およびカンピロバクター・フィータスの細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNA を識別しうるものであれば特に制限はなく、例えば、Sau3AI、Dsa I、Mbo I、Rsa I、EcoR I、Hin fI、Nde I、Pst I、Xba I、Xho IIが挙げられる。また、共通プライマー対としては、配列番号；７－１０、４７－５０から選択されるプライマー対、または該プライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるプライマー対を例示することができる。

【００６８】

このような、増幅したDNAを種々の制限酵素で処理し、生じる断片の長さから多型を検出する方法は、PCR-RFLP法（PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism：PCR-制限酵素断片長多型）と呼ばれる。本発明はまた、PCR-RFLP法に好適に用いられるプライマーを提供する。

【００６９】

また、本発明は、上記本発明の検出方法に用いるためのキットを提供する。これらキットは、上記したプライマー対の他、使用説明書を含むものである。さらなる他の要素を含んでいてもよい。

【００７０】

なお、カンピロバクター属細菌の存在の検出は、上記のようなDNAレベルだけでなく、タンパク質レベルで行なうことも考えられる。例えば、これら細菌の細胞膨張化致死毒に特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、あるいは免疫蛍光法などを実施し、これら細菌の細胞膨張化致死毒を検出することにより、被検試料中におけるこれら細菌の存在を評価することが可能である。

【実施例】

【００７１】

[実施例１]　カンピロバクター属菌株

2001年から2003年までの間に各種臨床材料より収集したカンピロバクター・ジェジュニ（C.ジェジュニ）菌、カンピロバクター・コリ（C.コリ）菌、およびカンピロバクター・フィータス（C.フィータス）菌を使用した。各菌株は、5％ウマ脱繊維血液（日本生物材料センター）、およびカンピロバクター選択サプリメントSR69（OXOID）を含む血液寒天培地（Blood Agar Base No.2：OXOID）を用い、C.ジェジュニおよびC.コリは5%02, 10% Co2, 85%N2ガス下42℃で、C.フィータスは25℃の条件下で、低温酸素/炭酸ガス培養装置（MODEL9200：和研薬）を使用し、培養した。

【００７２】

[実施例２]　PCR用テンプレートの調整

各菌種から5クローンを掻き取り500μLの無菌PBSに懸濁した。回収した細菌を10,000rpmで5分間遠心洗浄（MRX-150：トミー精工）した後、300μLの無菌PBSに再懸濁した。その後、沸騰水浴中で10分間煮沸し、氷上で冷却した後、15,000rpmで10分間遠心し、上清を回収した。回収上清中のDNA量を分光光度計（Ultrospec 3100pro：アマシャム・バイオサイエンス）を用いて定量した。定量した各菌体抽出液を各20ng/μLとなるよう希釈し、PCRに供した。

【００７３】

[実施例３]　C.コリcdtB プローブの作製とサザンハイブリダイゼーション

C.コリcdtBプローブはGNWとLPF-Dプライマーを用いてC.コリCol-192 菌体抽出液をテンプレートとしてDIGラベリングミックス（ロシュ）を用いてPCRラベルを行ない、作製した。

【００７４】

すなわち、C.コリのCDT遺伝子の存在を調べるため、文献（Pickett, C. et al. Infect. Immun., 64: 2070 (1996)）に記載されたGNW縮重プライマー［配列番号５：5'-GG(ACGT)AA(CT)TGGAT(ACT)TGGGG(ACGT)TA-3'］およびLPF-D縮重プライマー［配列番号６：5'-(AGT)AA(CT)TG(ACGT)AC(AGT)TA(ACGT)CC(AGT)AA (ACGT)GG3'］を用い、C.ジェジュニ3株、C.コリ2株につき、94℃，3分間－（94℃30秒，42℃30秒，72℃2分）×30サイクル－72℃，5分間の条件でPCRを行なった。その結果、C.ジェジュニ3株とC.コリ2株のすべてにおいて、約1.5Kbにcdt領域が増幅されたバンドが認められた（図１の矢印１）。

【００７５】

この増幅バンドをpT7ベクター（Novagen）にライゲートし、宿主大腸菌（E.coli JM109）に形質転換した。得られたクローンのシークエンスをシーケンサー（ABI PRISM 377 DNA sequencer：アプライドバイオシステムズ）を用いて確認したところ、cdtBに類似の配列が見られた。シークエンス反応はBigDye terminator Cycle Sequencing Kits（アプライドバイオシステムズ）を用いた。また、800bpのバンド（図１の矢印２）は、GNWプライマーがミックスプライマーであるため増幅されるcdtB由来の副バンドであることが確認された。

【００７６】

得られたプローブを用いて、C.コリCol-192のゲノム20μgを60Uの制限酵素HindIIIで37℃、12時間消化し、定法（Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Labolatory, Cold Spring Harbor, (2001)）に従ってサザンブロットおよびDNA-DNAハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、42℃でストリンジェントな条件下で実施した。ブロッティング後、2×SSC－0.1%SDS溶液で室温で5分間、2度洗浄し、さらに0.2×SSC－0.1%SDS溶液で60℃で15分間、2度洗浄した。

【００７７】

その結果、3kと4k付近にプローブ陽性バンドが得られた（図２）。この3kのバンドをpUC18 Vectorにライゲートし、E.coli JM109に形質転換して、cdtB領域を含むクローン（3k44）を得た。

【００７８】

［実施例４］　C.コリcdtB 遺伝子のシークエンス

実施例４で得られたC.コリcdtB領域を含む3k44クローンにつき、常法によりシークエンスを行い、配列番号１で示されるC.コリCDT全領域の配列を決定した。

【００７９】

［実施例５］　共通プライマー１の設計およびPCR

本発明のC.コリCDT配列と、既知のデータベースから得られたC.ジェジュニのCDT遺伝子を比較し、下記の共通プライマーUおよび共通プライマーRを設計した。20ng/μLの菌体抽出液1μL、各プライマーをそれぞれの濃度が0.5mMとなるように混合して添加し、PCR反応用緩衝液（TaKaRa Ex Taq kit：タカラバイオ）を用いて最終液量20μLとなるよう調整し、94℃3分間－（94℃30秒間、55℃30秒間、72℃1分間）×30サイクル－72℃3分間の条件でPCR反応に供した。結果を図３に示す。約1900bpの増幅断片が確認され、C.ジェジュニ（レーン２～４）およびC.コリ（レーン５、６）のいずれにもCDTに由来するバンドが認められた。

共通プライマーU［配列番号７：GATAA(CT)GATCCTTTAAAACT］

共通プライマーR［配列番号８：(AT)(AT)CCAAAGCG(AT)TTTT(CG)TATGG］

【００８０】

［実施例６］　共通プライマー２の設計およびPCR

同様にして、下記の共通プライマーUpおよび共通プライマーDoを設計し、94℃3分間－(94℃30秒間、50℃30秒間、72℃45秒間）×30サイクル－72℃3分間の条件でPCR反応に供した。結果を図４～６に示す。約720bpの増幅断片が確認された。

共通プライマーUp［配列番号９：ACTTGGAATTTGCAAGGC］

共通プライマーDo［配列番号１０：TCTAAAATTTAC(ACT)GGAAAATG］

【００８１】

［実施例７］　特異的プライマーの設計およびマルチプレックスPCRによるcdtB遺伝子の検出

本発明のC.コリCDT配列と、既知のデータベースから得られたC.ジェジュニのCDT遺伝子を比較し、下記のC.ジェジュニ特異的プライマーCjSPBU3およびCjSPBR3を設計した。同様にC.コリ特異的プライマーCcSPBU5およびCcSPBR5、C.フィータス特異的プライマーCfSPBU1およびCfSPBR1を設計した。

【００８２】

20ng/μLの菌体抽出液1μL、各プライマーをそれぞれの濃度が0.5mMとなるように混合して添加し、PCR反応用緩衝液（TaKaRa Ex Taq kit：タカラバイオ）を用いて最終液量20μLとなるよう調整し、94℃3分間－（94℃56秒間、55℃30秒間、72℃45秒間）×30サイクル－72℃3分間の条件でマルチプレックスPCR反応に供した（GeneAmp PCRシステム9700：アプライドバイオシステムズ）。結果を図７に示す。C.ジェジュニCDT特異的増幅断片（約750bp）、C.コリCDT特異的増幅断片（約400bp）、およびC.フィータスCDT特異的増幅断片（約530bp）が確認され、C.ジェジュニ（レーン２～４）、C.コリ（レーン５、６）、およびC.フィータス（レーン７、８）の識別が可能であった。

特異的プライマーCjSPBU3［配列番号１１：TACTCCGCCTTTTACCGCA］
特異的プライマーCjSPBR3［配列番号１２：GAGTATAGGTTTGTTGTC］
特異的プライマーCcSPBU5［配列番号１３：TTTAATGTATTATTTGCCGC］
特異的プライマーCcSPBR5［配列番号１４：TCATTGCCTATGCGTATG］
特異的プライマーCfSPBU1［配列番号１５：CGCAAGTTGGAAGACTAT］
特異的プライマーCfSPBR1［配列番号１６：TTTATTATCGCCGGAGCA］

【００８３】

［実施例８］　共通プライマー１を用いたPCR-RFLPによる菌種の同定

実施例６で得られた共通プライマー１を用いたPCRの完了後、8.5μLの反応液に5Uの制限酵素Sau3AI（NEB）を添加し、37℃で3時間反応させ、電気泳動を行った。結果を図８に示す。

【００８４】

［実施例９］　特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCRによるcdtB遺伝子の検出

実施例７で得られた特異的プライマーを用い、さらに種々のカンピロバクター属細菌の臨床菌株につき、実施例７の実験条件でマルチプレックスPCRを行った。結果を図９に示す。実施例７と同様に、C.ジェジュニCDT特異的増幅断片（約750bp）、C.コリCDT特異的増幅断片（約400bp）、およびC.フィータスCDT特異的増幅断片（約530bp）が確認され、各菌種の識別が可能であった。

【産業上の利用可能性】

【００８５】

本発明のプライマーは、カンピロバクター属細菌の疫学的調査、研究、およびカンピロバクター感染症の診断のみならず、カンピロバクター属細菌に汚染された食品の迅速診断、食品加工工程のバリデーション、食中毒発生時に迅速に原因菌を同定することが可能であり、感染の拡大防止に有用である。

【図面の簡単な説明】

【００８６】

【図１】GNWおよびLPF-Dプライマーを用いたC.コリCol-192菌体抽出液をテンプレートとしたPCRの結果を示す写真である。矢印１はcdt領域が増幅されたバンド（約1.5Kb）、矢印２のバンド（800bp）は、GNWプライマーがミックスプライマーであるために増幅されたcdtB由来の副バンドを示す。

【図２】C.コリCol-192菌体のゲノムの制限酵素HindIII消化後、ハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

【図３】共通プライマー１を用いたPCRの結果を示す写真である。レーン2～6の1.9kbp付近にCDT由来のバンドが認められる。

【図４】共通プライマー２を用いた各種C.ジェジュニ菌株のPCRの結果を示す写真。720bp付近にCDT由来のバンドが認められる。
【図５】共通プライマー２を用いた各種C.ジェジュニ菌株およびC.コリ菌株のPCRの結果を示す写真である。
【図６】共通プライマー２を用いたC.ジェジュニ菌株、C.コリ菌株、およびC.フィータス菌株のPCRの結果を示す写真である。
【図７】特異的プライマーを用いたC.ジェジュニ菌株、C.コリ菌株、およびC.フィータス菌株のマルチプレックスPCRの結果を示す写真である。各菌種に特有のCDT特異的増幅断片が確認された（C.ジェジュニ：750bp、C.コリ：400bp、C.フィータス：530bp）。
【図８】共通プライマー１を用いたC.ジェジュニ菌株、C.コリ菌株、およびC.フィータス菌株のPCR-RFLPの結果を示す写真である。
【図９】特異的プライマーを用いた各種C.ジェジュニ菌株、C.コリ菌株、およびC.フィータス菌株のマルチプレックスPCRの結果を示す写真である。各菌種に特有のCDT特異的増幅断片が確認された（C.ジェジュニ：750bp、C.コリ：400bp、C.フィータス：530bp）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.

<120> F2-A0301

<130> Method for detecting CDT and bacteria of the genus Campylobacter using it as a target

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 2211
<212> DNA
<213> Campylobacter coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (802)..(1605)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (1615)..(2187)
<223>

<400> 1

```
atg caa aaa ata aaa tta agc cta atg ttt ttg att gta aca atc att      48
Met Gln Lys Ile Lys Leu Ser Leu Met Phe Leu Ile Val Thr Ile Ile
1               5                  10                  15

ttt tta gct tgt tct tca aaa gaa caa caa atc aat cct tta gga aga      96
Phe Leu Ala Cys Ser Ser Lys Glu Gln Gln Ile Asn Pro Leu Gly Arg
            20                  25                  30

tct tac ggt aaa ttt aac gat aac gat cct tta aaa ctt ggt tca aaa     144
Ser Tyr Gly Lys Phe Asn Asp Asn Asp Pro Leu Lys Leu Gly Ser Lys
        35                  40                  45

cct aca ccc cct gtc aaa caa aaa aca cca agc ttg gta gaa ggt aaa     192
Pro Thr Pro Pro Val Lys Gln Lys Thr Pro Ser Leu Val Glu Gly Lys
    50                  55                  60
```

aaa ttt ccc gcc ata cca ctt gtc cca cct gta atc act cct aat acc　240
Lys Phe Pro Ala Ile Pro Leu Val Pro Pro Val Ile Thr Pro Asn Thr
65　　70　　75　　80

ttt aaa gga gat aat gcc gtc aaa ggc cca ttg cca agg cta aaa tct　288
Phe Lys Gly Asp Asn Ala Val Lys Gly Pro Leu Pro Arg Leu Lys Ser
85　　90　　95

cca aac gaa ttt gct tca aat gct tta tac gaa aac aca ggt atg gta　336
Pro Asn Glu Phe Ala Ser Asn Ala Leu Tyr Glu Asn Thr Gly Met Val
100　　105　　110

agt gat ttt gtc act att atg aat cct aat gga gca tct tta aca atc　384
Ser Asp Phe Val Thr Ile Met Asn Pro Asn Gly Ala Ser Leu Thr Ile
115　　120　　125

tgg gct tta aat cct ggc aat tgg ata tgg gga tat agt tta ttt gct　432
Trp Ala Leu Asn Pro Gly Asn Trp Ile Trp Gly Tyr Ser Leu Phe Ala
130　　135　　140

agt aga cct ttt gga gat gca aga gct tgg cag ctt att gaa ttt cca　480
Ser Arg Pro Phe Gly Asp Ala Arg Ala Trp Gln Leu Ile Glu Phe Pro
145　　150　　155　　160

aac aat aca gta atg att aaa aat gca aaa aca ttt act tgc tta aac　528
Asn Asn Thr Val Met Ile Lys Asn Ala Lys Thr Phe Thr Cys Leu Asn
165　　170　　175

gcc tat aga aat ggc atc gtt cat tat cct tgt gat caa aca aat ttt　576
Ala Tyr Arg Asn Gly Ile Val His Tyr Pro Cys Asp Gln Thr Asn Phe
180　　185　　190

gcg cag ttt tgg aga ctt tat ccg atg act aat gga gct tat caa att　624
Ala Gln Phe Trp Arg Leu Tyr Pro Met Thr Asn Gly Ala Tyr Gln Ile
195　　200　　205

caa aat ttt gcc acc caa caa tgt ata caa aca cct gtt tca aat gta　672
Gln Asn Phe Ala Thr Gln Gln Cys Ile Gln Thr Pro Val Ser Asn Val
210　　215　　220

atg gaa gaa ttt aat ttg agc ttt tat aat att tat tta acc gat tgt　720
Met Glu Glu Phe Asn Leu Ser Phe Tyr Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Cys
225　　230　　235　　240

ttg aaa gaa aaa gaa aag aat ttg gat aga cag tgg tat ata ggc gct　768
Leu Lys Glu Lys Glu Lys Asn Leu Asp Arg Gln Trp Tyr Ile Gly Ala
245　　250　　255

cct att taa ttttttcgct atgaaaggaa gata atg aaa aaa ata gta ttt　819

Pro Ile　　Met Lys Lys Ile Val Phe
260

ttg att tta agt ttt aat gta tta ttt gcc gct tta gaa aat tac aac　867
Leu Ile Leu Ser Phe Asn Val Leu Phe Ala Ala Leu Glu Asn Tyr Asn
265　270　275　280

acc gga act tgg aat ttg caa ggc tca tca gct gca act gaa agc aaa　915
Thr Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser Ala Ala Thr Glu Ser Lys
285　290　295

tgg aat gtt agt ata aga caa ctc ata acc ggt gca aat cct atg gat　963
Trp Asn Val Ser Ile Arg Gln Leu Ile Thr Gly Ala Asn Pro Met Asp
300　305　310

gtt tta gct gtt caa gaa gcg ggg gtt tta cct agt aca gct atg atg　1011
Val Leu Ala Val Gln Glu Ala Gly Val Leu Pro Ser Thr Ala Met Met
315　320　325

act cct aga cag gta caa ccc gtg ggc gtg ggt att cct ata cat gaa　1059
Thr Pro Arg Gln Val Gln Pro Val Gly Val Gly Ile Pro Ile His Glu
330　335　340

tac ata tgg aat tta ggc tct gta tca aga cct agc tct gtt tat ata　1107
Tyr Ile Trp Asn Leu Gly Ser Val Ser Arg Pro Ser Ser Val Tyr Ile
345　350　355　360

tat tat tct aga gtg gat gta gga gca aat cgt gtg aat tta gct atc　1155
Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn Arg Val Asn Leu Ala Ile
365　370　375

gtt agc aga gtg caa gcg gat gaa gtt ttt gtt tta ccc cct cca aca　1203
Val Ser Arg Val Gln Ala Asp Glu Val Phe Val Leu Pro Pro Pro Thr
380　385　390

gtt gct tca aga cct att ata ggc ata cgc ata ggc aat gat gct ttt　1251
Val Ala Ser Arg Pro Ile Ile Gly Ile Arg Ile Gly Asn Asp Ala Phe
395　400　405

ttc aat ata cac gct cta gca agt ggg gga aat gac gca gga gcc att　1299
Phe Asn Ile His Ala Leu Ala Ser Gly Gly Asn Asp Ala Gly Ala Ile
410　415　420

gtc gct gct gtg gat atg ttt ttt aga aat aga cct gat att aat tgg　1347
Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe Arg Asn Arg Pro Asp Ile Asn Trp
425　430　435　440

atg att tta ggc gat ttt aat aga gaa tca ggc gcc tta gta acc ttg　1395
Met Ile Leu Gly Asp Phe Asn Arg Glu Ser Gly Ala Leu Val Thr Leu
445　450　455

```
cta gat cct gac tta aga gca cgc act cgc gta gtt gtt ccg cct tct      1443
Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Arg Thr Arg Val Val Val Pro Pro Ser
            460                 465                 470

tct acg caa aca agt gga aga acg att gat tat gct atc act gga aat      1491
Ser Thr Gln Thr Ser Gly Arg Thr Ile Asp Tyr Ala Ile Thr Gly Asn
        475                 480                 485

tcc aac act gca gct tta tac aac cca cca ccg ata gtt gcg att tta      1539
Ser Asn Thr Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Pro Pro Ile Val Ala Ile Leu
    490                 495                 500

gct tta gaa gga tta aga acc ttt ttg gct tca gat cat ttt cct gta      1587
Ala Leu Glu Gly Leu Arg Thr Phe Leu Ala Ser Asp His Phe Pro Val
505                 510                 515                 520

aat ttt aga aga cct tag gagcttaat atg aaa aaa ttt ttt att tta ttt    1638
Asn Phe Arg Arg Pro                 Met Lys Lys Phe Phe Ile Leu Phe
                525                             530

ttt gcc ctt ttg agc ttt ttg aaa gca gag cct agc ttg gat gaa tta      1686
Phe Ala Leu Leu Ser Phe Leu Lys Ala Glu Pro Ser Leu Asp Glu Leu
    535                 540                 545

gca gac ttt act cct atg ttt gct ata aga tct tta gaa aca gga att      1734
Ala Asp Phe Thr Pro Met Phe Ala Ile Arg Ser Leu Glu Thr Gly Ile
550                 555                 560                 565

tct tta agt cct ttt aga aaa act tca aaa agg tta gaa gat caa aat      1782
Ser Leu Ser Pro Phe Arg Lys Thr Ser Lys Arg Leu Glu Asp Gln Asn
                570                 575                 580

tgg ttt tta aaa gag att gta gca aat gat gag cta aaa gct agg gat      1830
Trp Phe Leu Lys Glu Ile Val Ala Asn Asp Glu Leu Lys Ala Arg Asp
            585                 590                 595

atg cac gca aaa gat ttg cct ttt ggc tat gtt cag ttt ata agc cct      1878
Met His Ala Lys Asp Leu Pro Phe Gly Tyr Val Gln Phe Ile Ser Pro
        600                 605                 610

agg ggc gat gat ata tgc cta gct gtt tta agt gaa aaa agt ttt ggc      1926
Arg Gly Asp Asp Ile Cys Leu Ala Val Leu Ser Glu Lys Ser Phe Gly
    615                 620                 625

acc aaa tct tgc aaa caa gat ttg caa gat gga aca atg cag act att      1974
Thr Lys Ser Cys Lys Gln Asp Leu Gln Asp Gly Thr Met Gln Thr Ile
630                 635                 640                 645

ttt tct atc ata cca atg aca aat ggt tct ata caa att aga tct tta      2022
```

Phe Ser Ile Ile Pro Met Thr Asn Gly Ser Ile Gln Ile Arg Ser Leu
650 655 660

acc aat ggt ggc aat caa tgc atg agc act ttt cct gac tct agt atc 2070
Thr Asn Gly Gly Asn Gln Cys Met Ser Thr Phe Pro Asp Ser Ser Ile
665 670 675

gcc ata gaa aat cgc ttt ggt tta gga gaa tgc ctt ttg gat cgt tct 2118
Ala Ile Glu Asn Arg Phe Gly Leu Gly Glu Cys Leu Leu Asp Arg Ser
680 685 690

atc gta act gta tta agc aaa ctt ttc ttt ttc tcc cct gct ata atc 2166
Ile Val Thr Val Leu Ser Lys Leu Phe Phe Phe Ser Pro Ala Ile Ile
695 700 705

gaa gca agc gca att tac taa cacttttcta acaaaaccaa gctt 2211
Glu Ala Ser Ala Ile Tyr
710 715

<210> 2
<211> 258
<212> PRT
<213> Campylobacter coli

<400> 2
Met Gln Lys Ile Lys Leu Ser Leu Met Phe Leu Ile Val Thr Ile Ile
1 5 10 15

Phe Leu Ala Cys Ser Ser Lys Glu Gln Gln Ile Asn Pro Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Tyr Gly Lys Phe Asn Asp Asn Asp Pro Leu Lys Leu Gly Ser Lys
35 40 45

Pro Thr Pro Pro Val Lys Gln Lys Thr Pro Ser Leu Val Glu Gly Lys
50 55 60

Lys Phe Pro Ala Ile Pro Leu Val Pro Pro Val Ile Thr Pro Asn Thr
65 70 75 80

Phe Lys Gly Asp Asn Ala Val Lys Gly Pro Leu Pro Arg Leu Lys Ser
85 90 95

Pro Asn Glu Phe Ala Ser Asn Ala Leu Tyr Glu Asn Thr Gly Met Val
100 105 110

Ser Asp Phe Val Thr Ile Met Asn Pro Asn Gly Ala Ser Leu Thr Ile
115 120 125

Trp Ala Leu Asn Pro Gly Asn Trp Ile Trp Gly Tyr Ser Leu Phe Ala
130 135 140

Ser Arg Pro Phe Gly Asp Ala Arg Ala Trp Gln Leu Ile Glu Phe Pro
145 150 155 160

Asn Asn Thr Val Met Ile Lys Asn Ala Lys Thr Phe Thr Cys Leu Asn
165 170 175

Ala Tyr Arg Asn Gly Ile Val His Tyr Pro Cys Asp Gln Thr Asn Phe
180 185 190

Ala Gln Phe Trp Arg Leu Tyr Pro Met Thr Asn Gly Ala Tyr Gln Ile
195 200 205

Gln Asn Phe Ala Thr Gln Gln Cys Ile Gln Thr Pro Val Ser Asn Val
210 215 220

Met Glu Glu Phe Asn Leu Ser Phe Tyr Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Cys
225 230 235 240

Leu Lys Glu Lys Glu Lys Asn Leu Asp Arg Gln Trp Tyr Ile Gly Ala
245 250 255

Pro Ile

<210> 3
<211> 267
<212> PRT
<213> Campylobacter coli

<400> 3
Met Lys Lys Ile Val Phe Leu Ile Leu Ser Phe Asn Val Leu Phe Ala
1 5 10 15

Ala Leu Glu Asn Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser
20 25 30

Ala Ala Thr Glu Ser Lys Trp Asn Val Ser Ile Arg Gln Leu Ile Thr
35 40 45

Gly Ala Asn Pro Met Asp Val Leu Ala Val Gln Glu Ala Gly Val Leu
50 55 60

Pro Ser Thr Ala Met Met Thr Pro Arg Gln Val Gln Pro Val Gly Val
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ile His Glu Tyr Ile Trp Asn Leu Gly Ser Val Ser Arg

85 90 95

Pro Ser Ser Val Tyr Ile Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn
100 105 110

Arg Val Asn Leu Ala Ile Val Ser Arg Val Gln Ala Asp Glu Val Phe
115 120 125

Val Leu Pro Pro Pro Thr Val Ala Ser Arg Pro Ile Ile Gly Ile Arg
130 135 140

Ile Gly Asn Asp Ala Phe Phe Asn Ile His Ala Leu Ala Ser Gly Gly
145 150 155 160

Asn Asp Ala Gly Ala Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe Arg Asn
165 170 175

Arg Pro Asp Ile Asn Trp Met Ile Leu Gly Asp Phe Asn Arg Glu Ser
180 185 190

Gly Ala Leu Val Thr Leu Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Arg Thr Arg
195 200 205

Val Val Val Pro Pro Ser Ser Thr Gln Thr Ser Gly Arg Thr Ile Asp
210 215 220

Tyr Ala Ile Thr Gly Asn Ser Asn Thr Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Pro
225 230 235 240

Pro Ile Val Ala Ile Leu Ala Leu Glu Gly Leu Arg Thr Phe Leu Ala
245 250 255

Ser Asp His Phe Pro Val Asn Phe Arg Arg Pro
260 265

<210> 4
<211> 190
<212> PRT
<213> Campylobacter coli

<400> 4
Met Lys Lys Phe Phe Ile Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ala Glu Pro Ser Leu Asp Glu Leu Ala Asp Phe Thr Pro Met Phe Ala
20 25 30

Ile Arg Ser Leu Glu Thr Gly Ile Ser Leu Ser Pro Phe Arg Lys Thr
35 40 45

Ser Lys Arg Leu Glu Asp Gln Asn Trp Phe Leu Lys Glu Ile Val Ala
50 55 60

Asn Asp Glu Leu Lys Ala Arg Asp Met His Ala Lys Asp Leu Pro Phe
65 70 75 80

Gly Tyr Val Gln Phe Ile Ser Pro Arg Gly Asp Asp Ile Cys Leu Ala
85 90 95

Val Leu Ser Glu Lys Ser Phe Gly Thr Lys Ser Cys Lys Gln Asp Leu
100 105 110

Gln Asp Gly Thr Met Gln Thr Ile Phe Ser Ile Ile Pro Met Thr Asn
115 120 125

Gly Ser Ile Gln Ile Arg Ser Leu Thr Asn Gly Gly Asn Gln Cys Met
130 135 140

Ser Thr Phe Pro Asp Ser Ser Ile Ala Ile Glu Asn Arg Phe Gly Leu
145 150 155 160

Gly Glu Cys Leu Leu Asp Arg Ser Ile Val Thr Val Leu Ser Lys Leu
165 170 175

Phe Phe Phe Ser Pro Ala Ile Ile Glu Ala Ser Ala Ile Tyr
180 185 190

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n" = a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> "n" = c or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

<223> "n" = a, c or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> "n" =a, c, g or t

<400> 5
ggnaantgga tntggggnta 20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n" = a, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> "n" = c or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> "n" = a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> "n" = a, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> "n" = a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> "n" = a, g or t

<220>

<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> "n" = a, c, g or t

<400> 6
naantgnacn tanccnaang g 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> "n" = c or t

<400> 7
gataangatc ctttaaaact 20

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n" = a or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> "n" = a or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> "n" = a or t

<220>
<221> misc_feature

<222> (16)..(16)
<223> "n" = c or g

<400> 8
nnccaaagcg nttttntatg g 21

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9
acttggaatt tgcaaggc 18

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> "n" = a, c or t

<400> 10
tctaaaattt acnggaaaat g 21

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11
tactccgcct tttaccgca 19

<210> 12
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 12
gagtataggt ttgttgtc 18

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 13
tttaatgtat tatttgccgc 20

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14
tcattgccta tgcgtatg 18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15
cgcaagttgg aagactat 18

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16
tttattatcg ccggagca 18

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17
attatatgtt tatttttatc 20

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18
ccacagaaag caaatgga 18

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 19
agccactcca acaggacgcc a 21

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 20
tgatgaatat gagtggaatt tagg 24

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 21
ttcaagaatg caagctgaa 19

<210> 22
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 22
cagctgtaga tgcaca 16

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 23
tgatccttct actaacaagt 20

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 24
gacaacaaac ctatactc 18

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 25
gcaagtttaa agatctcata 20

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 26
cccctagat atcttaatga tac 23

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27
tgcaacaagg tggaacacc 19

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 28
caacccacca ccgatagtt 19

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29
agccactcca acaggacgcc a　　21

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 30
ctgtatcaag acctagctct g　　21

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 31
cattcgcata ggcaatga　　18

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 32
cgcaggagcc attgtcgctg ct　　22

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 33
tgacttaaga gcacgcactc g 21

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 34
ggattaagaa ccttttttgg 19

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 35
aagaccttag gagcttaata tg 22

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 36
cgtagttgtt ccgccttctt 20

<210> 37
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 37
gcgtcagagt aacgttttta aca 23

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 38
ttatatttat agcaacttta ggc 23

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 39
aaatttacct caaaccgctc ttc 23

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 40
aagcataaat caaggcgacg atc 23

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 41
gtatatctag accgttccaa 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 42
aaatcatcat cttgccgcct 20

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 43
ggaactcttg gattagaaac tc 22

<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 44
gcgtcagagt aacgttttta aca 23

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 45
agccgcccga tcttgtccga ac 22

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 46
gcaaacctgc ggactcacct a 21

<210> 47
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 47
ccacagaaag caaatgga 18

<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 48
ctaatcgtgt aaatttagct atagtt 26

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

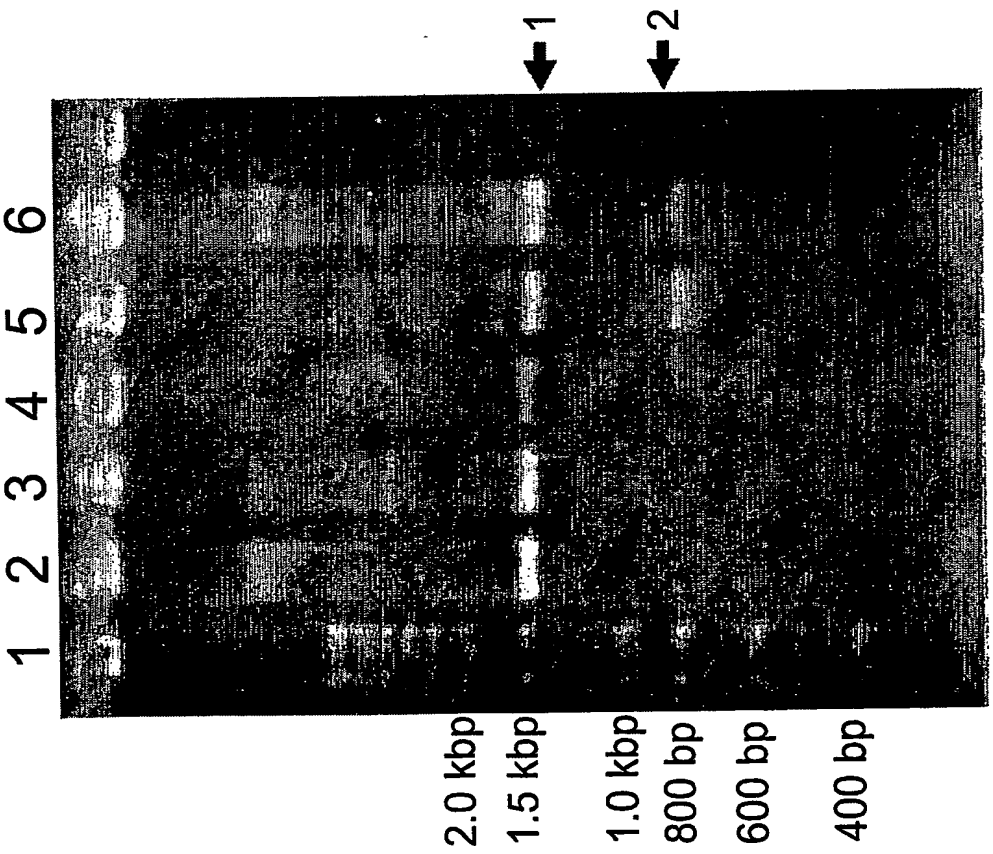
<400> 49
tttttcaata tccatgcttt agc 23

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

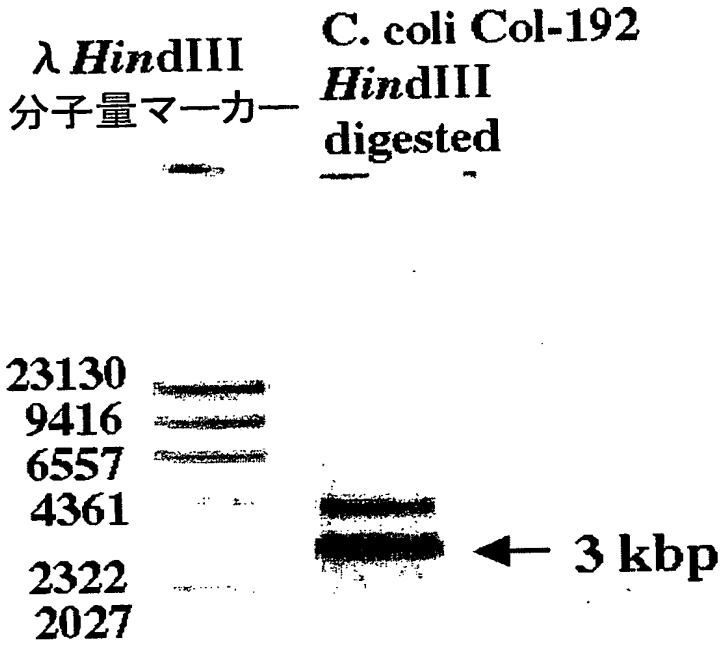
<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 50
tggatgatag caggggattt taa 23

【書類名】図面
【図１】

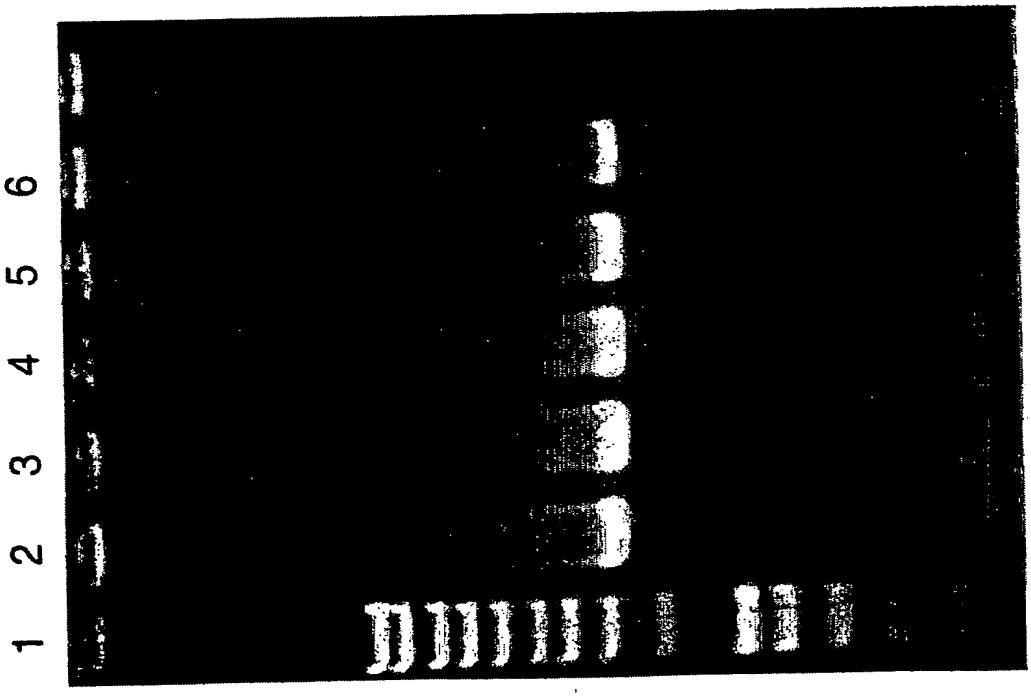

レーン1: 分子量マーカー
レーン2: C.jejuni Co1-8
レーン3: C.jejuni Co1-119,
レーン4: C.jejuni Co1-126
レーン5: C.coli Co1-192
レーン6: C.coli Co1-243
1 2 3 4 5 6
1
2
2.0 kbp
1.5 kbp
1.0 kbp
800 bp
600 bp
400 bp

【図２】

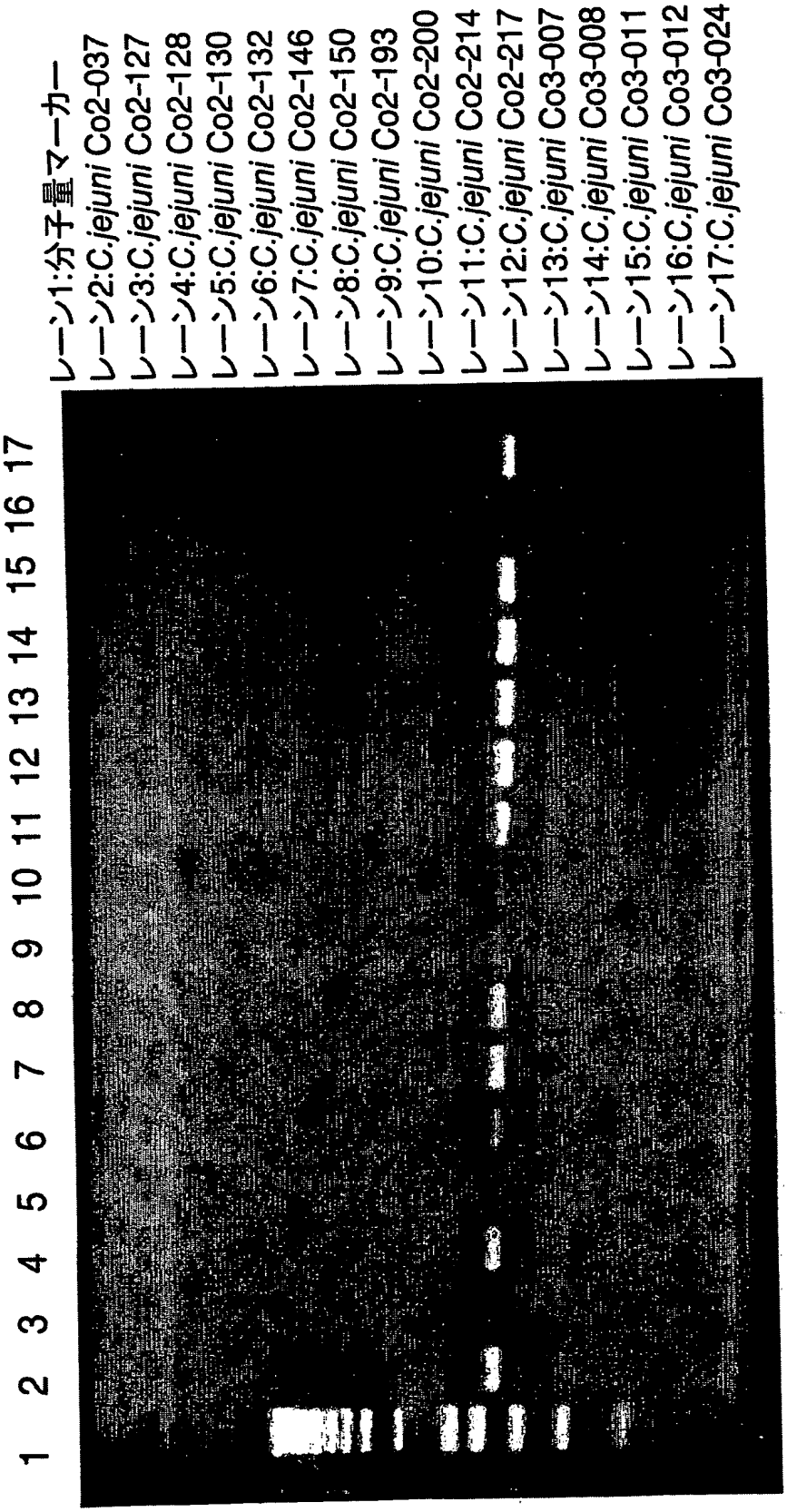

λ *Hin*dIII
分子量マーカー
C. coli Col-192
*Hin*dIII
digested
23130
9416
6557
4361
2322
2027
564
3 kbp

【図３】

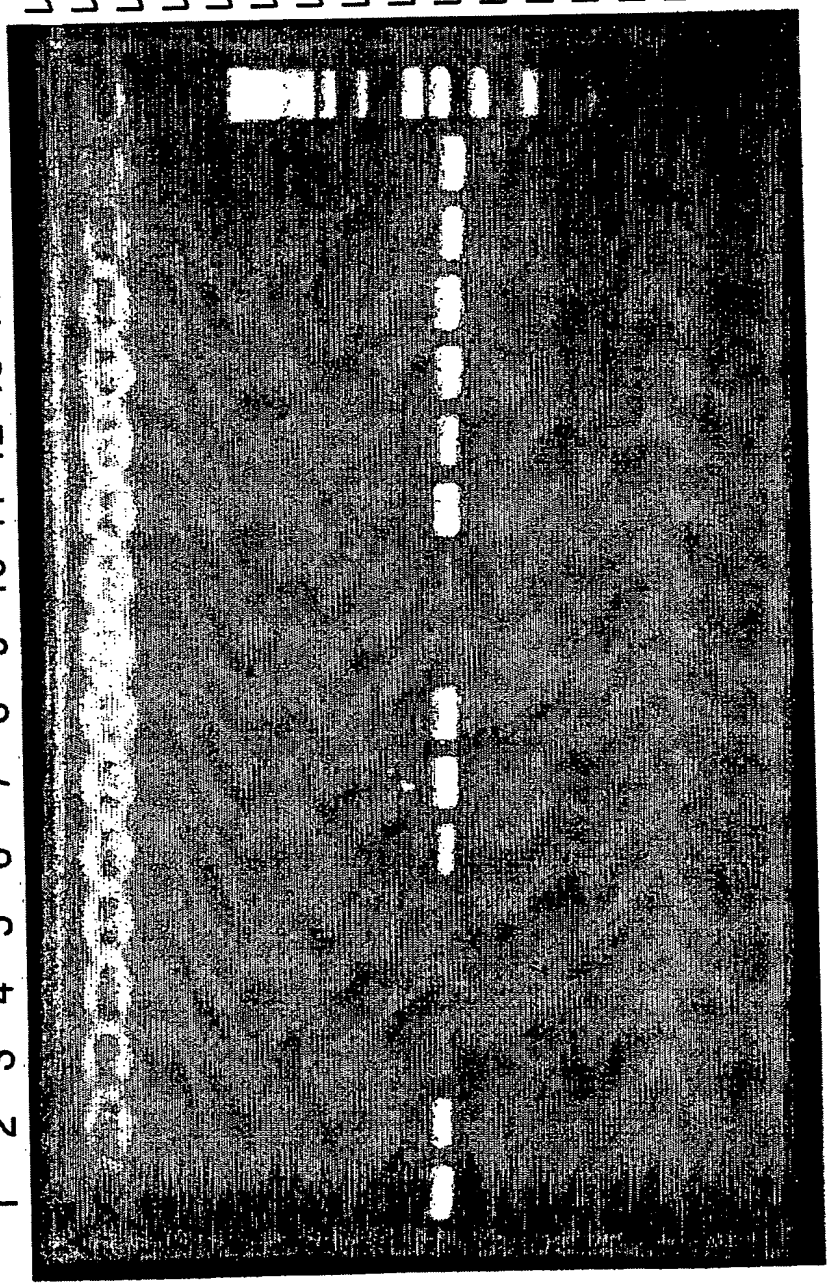
レーン1: 分子量マーカー
レーン2: *C.jejuni* Co1-8
レーン3: *C.jejuni* Co1-119
レーン4: *C.jejuni* Co1-126
レーン5: *C.coli* Co1-192
レーン6: *C.coli* Co1-243



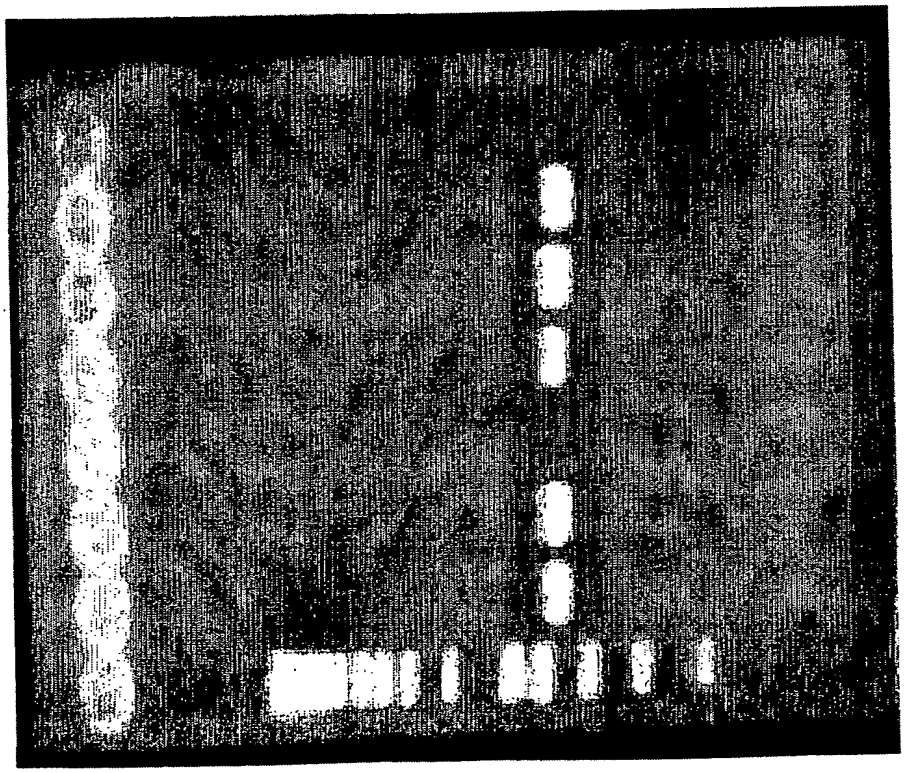
【図４】


レーン1:分子量マーカー
レーン2:C.jejuni Co2-037
レーン3:C.jejuni Co2-127
レーン4:C.jejuni Co2-128
レーン5:C.jejuni Co2-130
レーン6:C.jejuni Co2-132
レーン7:C.jejuni Co2-146
レーン8:C.jejuni Co2-150
レーン9:C.jejuni Co2-193
レーン10:C.jejuni Co2-200
レーン11:C.jejuni Co2-214
レーン12:C.jejuni Co2-217
レーン13:C.jejuni Co3-007
レーン14:C.jejuni Co3-008
レーン15:C.jejuni Co3-011
レーン16:C.jejuni Co3-012
レーン17:C.jejuni Co3-024
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

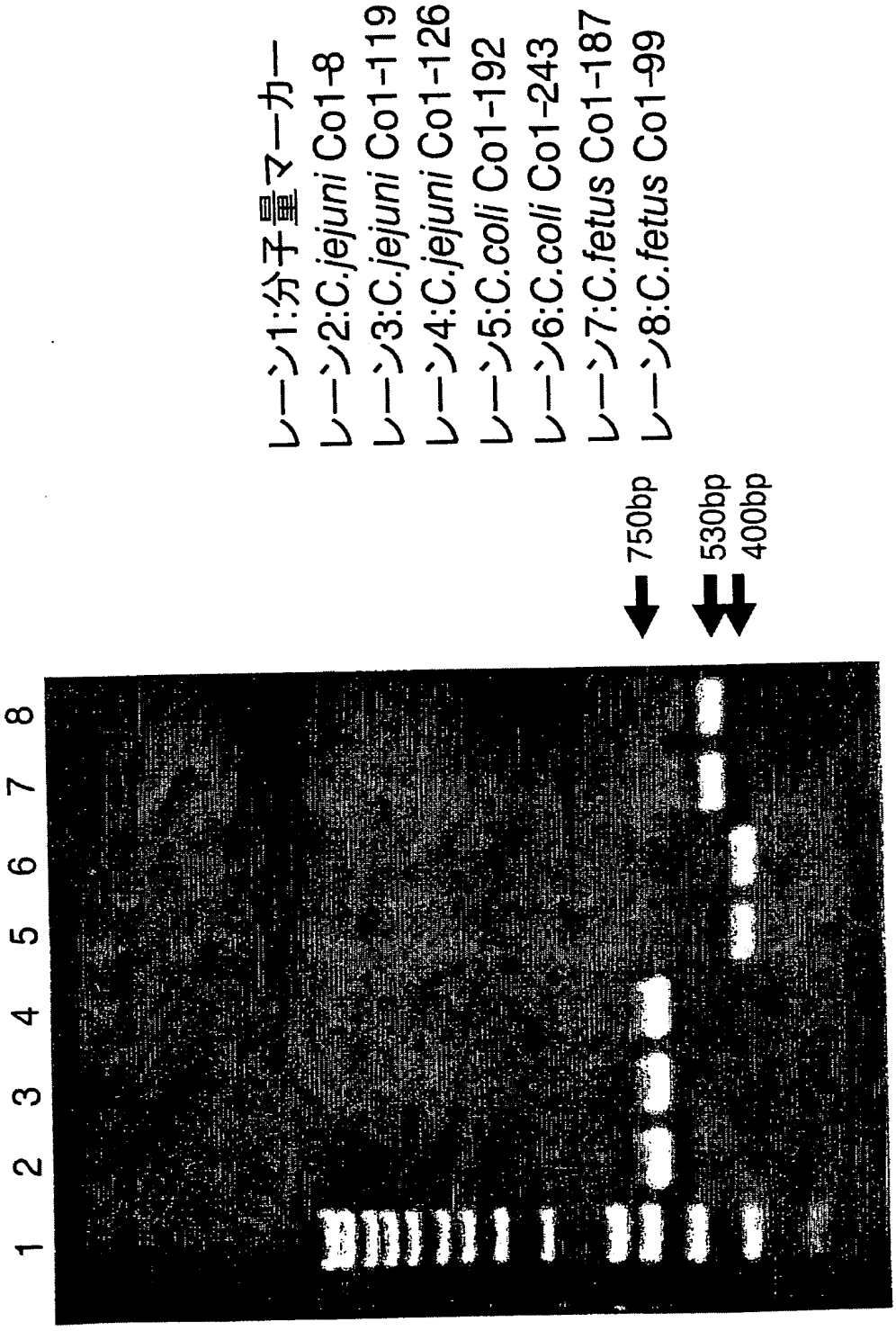
【図５】


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
レーン1:C.jejuni Co3-036
レーン2:C.jejuni Co3-072
レーン3:C.jejuni Co3-078
レーン4:C.jejuni Co3-082
レーン5:C.coli Co1-017
レーン6:C.coli Co1-071
レーン7:C.coli Co1-106
レーン8:C.coli Co1-124
レーン9:C.coli Co1-130
レーン10:C.coli Co1-194
レーン11:C.coli Co1-245
レーン12:C.coli Co1-247
レーン13:C.coli Co2-060
レーン14:C.coli Co2-082
レーン15:C.coli Co2-147
レーン16:C.coli Co2-173
レーン17:分子量マーカー

【図６】


1 2 3 4 5 6 7 8
レーン1:分子量マーカー
レーン2:C.coli Co2-215
レーン3:C.coli Co2-218
レーン4:C.coli Co3-134
レーン5:C.jejuni Co1-8
レーン6:C.coli Co1-192
レーン7:C.fetus Co1-187
レーン8:E.coli JM109

【図７】


レーン1:分子量マーカー
レーン2:C.jejuni Co1-8
レーン3:C.jejuni Co1-119
レーン4:C.jejuni Co1-126
レーン5:C.coli Co1-192
レーン6:C.coli Co1-243
レーン7:C.fetus Co1-187
レーン8:C.fetus Co1-99
750bp
530bp
400bp
1 2 3 4 5 6 7 8

【図８】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 34
レーン1:分子量マーカー
レーン2:C.jejuni Co2-037
レーン3:C.jejuni Co2-128
レーン4:C.jejuni Co2-132
レーン5:C.jejuni Co2-146
レーン6:C.jejuni Co2-150
レーン7:C.jejuni Co2-193
レーン8:C.jejuni Co2-200
レーン9:C.jejuni Co2-214
レーン10:C.jejuni Co2-217
レーン11:C.jejuni Co3-007
レーン12:C.jejuni Co3-008
レーン13:C.jejuni Co3-011
レーン14:C.jejuni Co3-024
レーン15:C.jejuni Co3-036
レーン16:C.jejuni Co3-072
レーン17:C.jejuni Co3-078
レーン18:C.coli Co1-071
レーン19:C.coli Co1-106
レーン20:C.coli Co1-124
レーン21:C.coli Co1-194
レーン22:C.coli Co1-245
レーン23:C.coli Co1-247
レーン24:C.coli Co2-060
レーン25:C.coli Co2-082
レーン26:C.coli Co2-147
レーン27:C.coli Co2-173
レーン28:C.coli Co2-215
レーン29:C.coli Co2-218
レーン30:C.jejuni Col-8
レーン31:C.coli Col-192
レーン32:C.fetus Col-187
レーン34:分子量マーカー

【図９】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
35 36 37 38 39 40 41 42
1:750bp
2:530bp
3:400bp
レーン1, 34, 35:分子量マーカー
レーン2:C.jejuni Co2-037
レーン3:C.jejuni Co2-127
レーン4:C.jejuni Co2-128
レーン5:C.jejuni Co2-130
レーン6:C.jejuni Co2-132
レーン7:C.jejuni Co2-146
レーン8:C.jejuni Co2-150
レーン9:C.jejuni Co2-193
レーン10:C.jejuni Co2-200
レーン11:C.jejuni Co2-214
レーン12:C.jejuni Co2-217
レーン13:C.jejuni Co3-007
レーン14:C.jejuni Co3-008
レーン15:C.jejuni Co3-011
レーン16:C.jejuni Co3-012
レーン17:C.jejuni Co3-024
レーン18:C.jejuni Co3-036
レーン19:C.jejuni Co3-072
レーン20:C.jejuni Co3-078
レーン21:C.jejuni Co3-082
レーン22:C.coli Co1-017
レーン23:C.coli Co1-071
レーン24:C.coli Co1-106
レーン25:C.coli Co1-124
レーン26:C.coli Co1-130
レーン27:C.coli Co1-194
レーン28:C.coli Co1-245
レーン29:C.coli Co1-247
レーン30:C.coli Co2-060
レーン31:C.coli Co2-082
レーン32:C.coli Co2-147
レーン33:C.coli Co2-173
レーン36:C.coli Co2-215,
レーン37:C.coli Co2-218
レーン38:C.coli Co3-134
レーン39:C.jejuni Col-8
レーン40:C.coli Col-192
レーン41:C.fetus Col-187
レーン42:E coli JM109

【書類名】要約書
【要約】
【課題】　カンピロバクター・コリのCDTおよびそれをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。さらに、カンピロバクター・コリを含むカンピロバクター属細菌のCDTを標的とした、カンピロバクター属細菌の存在を迅速に検出しうる方法を提供することを課題とする。
【解決手段】　本発明者らは、未だ知られていなかったC.コリのCDT遺伝子をクローニングし、配列決定することに成功した。また、C.ジェジュニ、C.フィータスのCDTとの比較を行ない、両者に共通するプライマーおよび特異的なプライマーを開発した。そしてこのプライマーが、簡便かつ迅速にカンピロバクター属細菌CDTの有無の判定、および菌種の同定が同時に行えるマルチプレックスPCR法に適用でき、さらにPCR-RFLP法によるタイピングにも利用できることを明らかにした。
【選択図】　なし

特願２００３－４０８１０３

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　[０００２３８２０１]

１．変更年月日　　１９９０年　８月　８日
[変更理由]　　新規登録
住　所　　大阪府大阪市中央区道修町１丁目７番１０号
氏　名　　扶桑薬品工業株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018042

International filing date: 03 December 2004 (03.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-408103
Filing date: 05 December 2003 (05.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)

World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☑ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☑ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☑ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.